

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018410

International filing date: 09 December 2004 (09.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-413629
Filing date: 11 December 2003 (11.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

13.12.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 1 1 日
Date of Application:

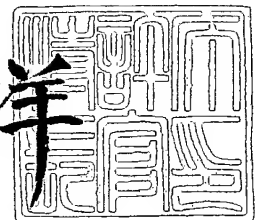
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 1 3 6 2 9
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 1 3 6 2 9]

出 願 人 久光製薬株式会社
Applicant(s): 千葉県

2 0 0 5 年 1 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 1041
【提出日】 平成15年12月11日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
C12Q 1/68
C12N 15/52

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区仁戸名町 6 6 6 - 2 千葉県がんセンター内
【氏名】 中川原 章

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区仁戸名町 6 6 6 - 2 千葉県がんセンター内
【氏名】 宮崎 耕

【特許出願人】
【識別番号】 000160522
【氏名又は名称】 久光製薬株式会社

【代理人】
【識別番号】 100088155
【弁理士】
【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】
【識別番号】 100092657
【弁理士】
【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 014708
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とTRAP δ との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法。

【請求項 2】

FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1およびDv11との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法。

【請求項 3】

FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法。

【請求項 4】

FALSの臨床悪性度の判定におけるNEDL1またはその基質の使用。

【請求項 5】

単離SOD1変異体を用いることを特徴とする請求項 4 に記載のNEDL1の使用。

【請求項 6】

前記基質がTRAP δ またはDv11であることを特徴とする請求項 5 に記載のNEDL1の使用。

【請求項 7】

SOD1変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤。

【請求項 8】

前記基質がTRAP δ またはDv11であることを特徴とする請求項 7 であることを特徴とする請求項 7 に記載の阻害剤。

【請求項 9】

神経細胞において、候補薬剤がSOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤であるか否かを決定することを特徴とする、FALSの治療において有用な薬剤をスクリーニングする方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】FALSの臨床悪性度の判定方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、NEDL1およびその関連因子と、SOD1変異体との相互作用に基づく、FALSの判定方法、或いは治療薬（方法）に関する。

【背景技術】

【0002】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、脊椎、運動皮質、脳幹の運動ニューロンの変性、脱落により筋萎縮を生じる、予後不良の神経変性疾患である。現在、家族性のALS(familial lateral sclerosis: 以下、FALSという)は、ALS全体の5~10%の頻度で認められるが、その一部の家系で原因遺伝子が、CU/Znスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)遺伝子であることが判明しており、FALS全体の約20%がSOD1遺伝子変異を原因としている。SOD1は、好気性代謝の過程で細胞内に生じる活性酸素の一種であり、スーパーオキシドを不活性化する。近年、変異型SOD1 (以下、SOD1変異体という)が細胞内で凝集体を形成し、細胞毒性を発揮するという凝集体仮説がFALSの病因として最も有力なものとされつつある(非特許文献1)。

【0003】

本発明者らは、以前予後良好な神経芽腫と予後不良な神経芽腫との比較において、予後良好な神経芽腫で発現が増強されているNEDL1と命名した新規なHECT型ユビキチンライゲースを見出した(特許文献1)。さらに、NEDL1はSOD1変異体をユビキチン化することも見出した。

【0004】

SOD1変異体の細胞内情報伝達経路については、不明な部分が多いがSOD1変異体のみと結合し、正常SOD1(野生型SOD1)とは結合しない蛋白因子として、小胞体トランスロコン成分であるTRAP δ (translocon-associated protein complex)が報告されている(非特許文献2、非特許文献3)。

【0005】

このようにFALSの原因遺伝子であるSOD1変異体とその関連分子との間の相互作用については、解明されつつあるが、FALSの病理発生については、前記凝集体仮説が正しいとしてもそのメカニズムの全容の解明には程遠い現状である。

【特許文献1】国際公開WO 03/018842パンフレット

【非特許文献1】中野亮一、細胞工学、第20巻、第11号、1508-1512、2001

【非特許文献2】Ryen D. Fons, et al, The Journal of Cell Biology, Vol. 160, No. 4, 2003 (529-539)

【非特許文献3】Kunst C.B., et al, Nat. Genet. 15, 91-94 (1997)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

SOD1変異体とその関連分子との間の相互作用におけるNEDL1の役割について明らかにし、FALSの発症メカニズムの凝集体仮説を検証する。その過程において、各種分子間の結合、相互作用を評価すると、FALSの治療・診断につながる知見が得られる可能性がある。

【0007】

本発明は、SOD1変異体とその関連分子との結合、相互作用(NEDL1が介在するか、または介在しない)を遺伝子または蛋白レベルで解明することを1つの目的とする。さらに、本発明は、そこで得られた知見を臨床に応用すること、すなわちFALSの新たな治療剤(方法)、診断薬(方法)を提供することを別の目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、NEDL1がTRAP δ とが結合し、さらにこれらはSOD1変異体と複合体を形成

して、該複合体における結合強度はFALSの臨床悪性度とほぼ比例することを見出した。さらに、同様にNEDL1がDishevel111(以下、Dvl1という)と結合し、さらにこれらはSOD1変異体と複合体を形成して、該複合体における結合強度はFALSの臨床悪性度とほぼ比例することを見出した。また、NEDL1とSOD1変異体との相互作用もFALSの臨床悪性度とほぼ比例することを見出した。

【0009】

特定的には、FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とTRAP δ との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法が提供される。

【0010】

また、FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1およびDvl1との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法も提供される。

【0011】

また、FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法も提供される。

【0012】

要するに、本発明はFALSの臨床悪性度の判定におけるNEDL1またはその基質の使用を提供する。具体的には、その判定において、単離SOD1変異体を用いることを特徴とする。ここで、好ましくは前記基質は、TRAP δ またはDvl1である。

【0013】

くわえて、SOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤が提供される。

【0014】

好ましくは、前記基質がTRAP δ またはDvl1である。

【0015】

また、神経細胞において、候補薬剤がSOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤であるか否かを決定することを特徴とする、FALSの治療において有用な薬剤をスクリーニングする方法も提供される。

【発明の効果】

【0016】

本発明に従えば、FALSの原因遺伝子であるSOD1変異体とその関連分子（TRAP δ 、Dvl1等）との間にNEDL1が介在して、複合体が形成されることが明らかとなり、FALSの発症メカニズムとしての凝集体説が確かめられた。さらに、このような複合体におけるSOD1変異体と前記分子との結合能（NEDL1を介するか、介さないかして）がFALSの臨床悪性度に関連しているので、該結合能を評価することによって、FALSの臨床悪性度を判定することができる。

【0017】

また、上記の凝集体の形成を阻止することができれば、FALSの治療に繋がる。したがって、本発明に従えば、FALSの治療に有用であろう、SOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤が見出される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明について、好適な実施の形態を参照して、詳細に説明する。

【0019】

本発明に係るNEDL1遺伝子は、全長6200塩基（コード領域4755塩基）を有する遺伝子であり、その塩基配列を配列表の配列番号2に示す。該遺伝子がコードするNEDL1タンパク質は、1585個のアミノ酸からなり、その全長を配列表の配列番号1に示す。なお、前記塩基配列およびアミノ酸配列は、GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.) に受理番号AB048365として登録されている。

【0020】

図1にヒトNEDL1(hNEDL1)とマウスNEDL1(mNEDL1)のアライメント（ホモロジー解析）を

示す。NEDL-1タンパク質は、HECT型ユビキチンリガーゼの特徴である以下のドメインを有することが分かる。すなわち、(1)N末端にC2ドメイン（カルシウム依存的に膜脂質に結合する）、(2)中央部にWWドメイン（プロリンリッチ領域との結合に関与）、(3)C末端領域にHECTドメイン（ユビキチン結合酵素E2の結合部位）である。

【0021】

NEDL1の基質を同定するために、本発明者らは、前記WWドメイン（757-1114位）を用いて、yeast two hybridスクリーニングを行った。その結果、1つの基質としてTRAP δ が見出された。

【0022】

TRAP δ は、小胞体膜を横切るタンパク質のトランスロケーションに関連する因子である、トランスロコン（translocon-associated protein）複合体の構成タンパク質の1つのサブユニットである。TRAP δ が野生型SODとは結合しないが、SOD1変異体と結合することは既に報告されている（Kunst C.B. ら、前掲）。そこで、本発明者らは、NEDL1、TRAP δ 、およびSOD1間の相互作用を調べた。具体的には、COS7細胞をこれらの発現構築物で共トランスフェクトし、免疫ブロットおよび免疫沈降アッセイによって、解析した。

【0023】

NEDL1とTRAP δ との結合

上記の解析の結果、図2、3に示すように、NEDL1は、内因性および外因性のTRAP δ と結合していることが確認される。この結合は、yeast two-hybridスクリーニングでも前記WWドメインを介していることが確認される。しかし、TRAP δ は、NEDL1によってユビキチン化されない。

【0024】

NEDL1とSOD1との結合

上記の解析の結果、図4に示すように、NEDL1は、SOD1変異体と結合するが、野生型SOD1とは結合しないことが確認される。また、NEDL1と様々なSOD1変異体との結合能は、SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

【0025】

くわえて、NEDL1がSOD1変異体をユビキチン化することが確認され（図5）、そのユビキチン化の程度は、SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

【0026】

NEDL1の存在下、SOD1変異体の分解の経時変化を示したものが、図6であるが、ここでも臨床悪性度に比例して、SOD1変異体が分解していることが分かる。

【0027】

これらの結果から、SOD1変異体のユビキチン化を経由する分解には、NEDL1が介在し、臨床悪性度に比例して、分解が進行することが示される。

【0028】

TRAP δ とSOD1との結合

上記の解析の結果、図7に示すように、外因性TRAP δ は、SOD1変異体と結合するが、野生型SOD1とは結合しないことが確認される。また、NEDL1の場合と同様に、TRAP δ と様々なSOD1変異体との結合能は、SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

【0029】

以上の結果および他の研究結果を総合して、FALSの病理発生におけるNEDL1の役割として、(1)NEDL1は、単独でまたはTRAP δ と共にSOD1変異体をユビキチン化する(2)NEDL1とTRAP δ は、SOD1変異体と凝集体を形成し、これがゴルジ装置の断片化を誘起、ニューロンのアポトーシスをもたらす(3)凝集体の形成は、NEDL1および／またはTRAP δ の機能不全を引き起こし、それが運動ニューロン死に結びつく疾患となる(4)NEDL1/TRAP δ /SOD1変異体の凝集体は、その正常な機能が運動ニューロンの生存に重要である分子シャペロンのような因子を取り込み、不活性化する、などであろう。

【0030】

次いで、ユビキチン化依存性蛋白分解時のNEDL1の基質を同定するために、本発明者らは、NEDL1のWWドメインを含む別のドメイン(382-1448位)を用いて、yeast two hybridスクリーニングを行った。その結果、Dvl1が基質として同定された。

【0031】

ヒトDvl1は、670個のアミノ酸からなるタンパク質で、以下のドメインを有する。すなわち、(1)カノニカルWnt/TCFシグナリングに必要とされるDIXドメイン、(2)PDZドメイン(Stbm、CKI結合の標的)、(3)DEPドメイン(PCPシグナリング中の膜局在化に関与)である(D. J. Sussman et al., Dev. Biol. 166, 73-86 (1994); A. Wodarz et al., Cell Dev. Biol. 14, 59-88 (1998); M. Boutros et al., Cell, 94, 109-118 (1998))であり、DEPドメインとNEDL1のWWドメインが結合するものと考えられる。

【0032】

TRAP δ の場合と同様に、NEDL1、Dvl1およびSOD1間の相互作用を調べた。具体的には、COS7細胞をこれらの発現構築物で共トランスフェクトし、免疫プロットおよび免疫沈降アッセイによって、解析した。

【0033】

NEDL1とDvl1との結合

上記の解析の結果、図8に示すように、NEDL1は、Dvl1と結合していることが確認される。また、NEDL1は、Dvl1をユビキチン化することが確認され、(図9)さらにNEDL1の存在下、Dvl1の分解の経時変化を示したものが図10である。

【0034】

Dvl1とSOD1との結合

上記の解析の結果、図11に示すように、Dvl1は、SOD1とNEDL1の存在下結合することが確認される。また、Dvl1と様々なSOD1変異体との結合能は、SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

【0035】

ALS患者の運動ニューロンで細胞骨格異常が報告されており、NEDL1介在Dvl1分解に対する前記のSOD1変異体の影響が運動ニューロン死に関与していることは可能である(Luo, Z. G. et al., Neuron 35, 489-505(2002))。

【0036】

結論

神経細胞E3ユビキチンリガーゼであるNEDL1は、TRAP δ と結合(相互作用)するが、Dvl1とも結合し、これをユビキチン化して分解する。NEDL1は、このようにSOD1変異体、Dvl1、TRAP δ と複合体を形成するので、特にユビキチン介在の分解を逃れたSOD1変異体と巨大な凝集体を形成する。標的タンパク質(基質)であるDvl1またはTRAP δ の活性に影響を与えるNEDL1の機能は、SOD1変異体によって調節される。これら個々の相互作用がすべて、FALSの病理発生に関係しているようである。したがって、前記複合体もしくは巨大凝集体形成の分子メカニズムの解明は、ALSにおける運動ニューロン死を説明し、ひいてはALSに対する新たな治療薬・治療方法の展望を開くことになる。図12に、本発明において得られた知見に基づく、FALS病理発生におけるSOD1変異体とその関連分子との間の相互作用の模式図を示す。

【0037】

FALSの治療剤および治療方法

上記のような考察に基づいて、本発明によれば、SOD1変異体とNEDL1および/またはその基質との相互作用における阻害剤の開発が提供される。阻害剤としての候補薬剤は、核酸、タンパク質、低分子化合物(化学合成または天然由来)、タンパク質以外的高分子化合物などである。

【0038】

このような阻害剤のスクリーニング方法としては、Two-Hybrid System(例えば、Gyuris, J. Cell, 1993, 75, 791-803; Golemis, E. A., Current Protocols in Molecular Bio

logy (John Wiley & Sions, Inc.) 1996, Ch. 20.0-20.1)が挙げられる。また、免疫学的手法で、阻害剤のスクリーニング法を実施することもできる。具体的には、細胞（神経細胞）内でSOD1変異体（特に、臨床悪性度の高いもの）とNEDL1および／またはその基質を発現させ、一定時間候補薬剤と共に培養した後、細胞を粉砕して細胞溶解液を調製する。一方の分子に対する抗体で免疫沈降させ、沈殿中に含まれる他方の分子（それ以外）を免疫学的手法（免疫プロット等）で検出ないし、定量することで、候補薬剤の各分子の相互作用に及ぼす影響を検出できる。ここで、上記培養系に適当なアゴニストと候補薬剤とを同時に添加して、上記アッセイを行い、候補薬剤を含まない細胞からの免疫沈降物と比較することで阻害剤のスクリーニングが可能である。

【0039】

上記のスクリーニング方法で同定されたSOD1変異体とNEDL1および／またはその基質における阻害剤であるタンパク質等は、FALSを患う患者またはその可能性のある患者に経口的に、または非経口的に投与する。この目的で、そのタンパク質を薬学的組成物として調製する。これは、有効量の該結合阻害を薬学的に許容される担体、もしくは希釈剤と混合して、適当な剤形とする。投与に適した剤形は、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、カプセル剤、坐剤、注射剤等である。

【実施例】

【0040】

(方法)

(ヒトNEDL1 cDNAのクローニング)

ヒトNEDL1 cDNAのクローニングについては、国際公開WO 03/018842パンフレット (PCT/JP02/08524) に詳述してあるが、本発明では、以下のようにして、実施した。すなわち、フォワード・プライマー (5' -GGTTTTTAGGCCTGGCCGCC-3'、配列番号3) およびリバース・プライマー (5' -CAATGAGGTACATGCCAATCC-3'、配列番号4) を使用し、ヒト胎児脳 (Stratagene社製) をテンプレートとして、NEDL1cDNA (ヒト神経芽細胞種からのcDNAライブラリー) の5' 部分を増幅した。全長ヒトNEDL1 cDNAは、PCR増幅断片 (ヌクレオチド1位 (翻訳開始部位) ~68位) とKIAA0322 cDNA ((財) かずさDNA研究所、T.Nagase氏より寄贈) と融合させて、作成した。

【0041】

(細胞培養およびトランスフェクション)

細胞は、10%熱不活性化ウシ胎児血清 (FBS、Life Technologies, Inc.)、ペニシリン (100IU/ml)、ストレプトマイシン (100 μ g/ml) を添加したRPMI1640培地で増殖した。COS7およびNeuro2a細胞は、10%熱不活性化ウシ胎児血清とペニシリン (100IU/ml) / ストレプトマイシン (100 μ g/ml) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium: DMEM) に維持した。細胞は、空气中水飽和5%炭酸ガス雰囲気下、37℃で培養した。各発現プラスミドの共トランスフェクションは、製造者の指示書に従い、リポフェクトアミン (LipofectAMINE、Life Technologies, Inc. 社製) を用いて実施した。ある種の実験では、トランスフェクトした細胞をMG-132を用いて、終濃度40 μ Mで30分間処理した。

【0042】

(Yeast Two-Hybrid Screening)

スクリーニングは、ヒト胎児脳 (1次スクリーニング) およびヒト成人脳 (2次スクリーニング) から得られたcDNAライブラリーを用いる、Gal4-based matchmaker two-hybrid system (Clontech社製) を使用して実行した。Saccharomyces cerevisiae CG1945細胞をpAS2-1-NEDL1-1 (757-1114位、1次スクリーニング) またはpAS2-1-NEDL1-2 (382-1448位、2次スクリーニング) で形質転換した。これらの発現ベクターは共にLacZの転写のみを活性化しない。形質転換体をさらに前記cDNAライブラリーで形質転換した。LacZ陽性コロニーを選択した。これら陽性コロニーからプラスミドDNAを抽出して、その核酸配列を決定した。

【0043】

(インビトロユビキチン化アッセイ)

インビトロユビキチン化アッセイは、以下のように実施した。0.5 μ gの精製GST融合蛋白、0.25 μ g酵母E1 (Boston Biochem社製)、E2sを発現するE. coliからの粗細胞溶解物1 μ lおよび10 μ gウシUb (Sigma社製)を250 mM Tris-HCl (pH7.6)、1.2 M NaCl、50 mM ATP、10 mM MgCl₂、および30 mM ジチオスレイトール中でインキュベートした。30℃で2時間後、SDSサンプルバッファを添加して、反応を停止した。試料をSDS-PAGEで分析し、メンブランに移し、抗ユビキチンモノクローナル抗体 (Medial Biological Laboratories社製)で免疫ブロットした。

【0044】

(発現構築物)

ヘマグルチニンタグおよび(His6)タグされたユビキチンの哺乳動物用発現プラスミドは、D. Bohmann氏より寄贈された。全長NEDL1 cDNAを哺乳動物用発現プラスミドpEF1/His (Invitrogen社製)またはpIRESpuo2 (Clontech社製)に導入した。野生型または変異型のSOD1をコードするcDNAをFLAGもしくはMycエピトープタグ配列のカルボキシ末端に接合し、pIRESpuo2にサブクロニングした。同様に、FLAGもしくはMycエピトープタグをTRAP δ のカルボキシ末端に接合した。さらに、FLAGもしくはMycエピトープタグをDvl1のアミノ末端に接合した。コード配列は、自動DNA塩基配列決定によって確認した。

【0045】

(免疫沈降およびウエスタンブロット分析)

ウサギでNEDL1オリゴペプチド(460-482位)とTRAP δ オリゴペプチド(93-126位)に対して、それぞれ抗NEDL1抗体と抗TRAP δ 抗体を作成した。免疫沈降実験では、COS7細胞またはNeuro2a細胞を様々な組合わせで、発現プラスミドを用いて共トランスフェクトした。48時間後、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma社製)を追加したTNEバッファ(10 mM Tris-HCl pH 7.8、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM EDTA、1 mM PMSF)中で細胞溶解した。全細胞溶解物を抗NEDL1抗体、抗FLAG抗体(M2、Sigma社製)または抗Myc抗体(9B11、Cell Signaling Technology社製)を用いて、免疫沈降させた。免疫複合体をGTP結合タンパク質セファロースビーズ上で回収し、Laemmliサンプルバッファ中で沸騰させて溶出し、SDSポリアミドゲルで電気泳動し、エレクトロブロットによりポリビニリデンジフルオリドメンブラン (Immobilon、Millipore社製)に移した。ユビキチン化実験では、細胞溶解をRIPAバッファ(10 mM Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl、1% NP-40、0.1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1 mM EDTA)中で実施し、その後強力な超音波処理を行った。メンブランを第1抗体でプローブし、それからホースラディッシュペルオキシダーゼ (Jackson Immuno Research Laboratories/Southern Biotechnology Associates, Inc. 製)で標識した二次抗体とともにインキュベートした。免疫反応性のバンドをECL増強化学発光法 (Amersham Pharmacia Biotech社)によって検出した。タンパク質分解実験では、Neuro2細胞を所定の発現プラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞をシクロヘキシミド (Sigma社製)の50 μ g/ml濃度で所定時間処理した。その後、全細胞溶解物の等量(50 μ g)をウエスタンブロットにかけ、続いてIntelligent Quantifier software (Bio Image社製)を用いて、定量した。

【0046】

(実施例1) NEDL1とTRAP δ との結合

COS7細胞を図2に示した発現プラスミド (NEDL1およびFLAG-TRAP δ) で共トランスフェクトした。全細胞溶解物を抗FLAG抗体 (第1パネル) または抗NEDL1抗体 (第2パネル) で免疫沈降(IP)させた。免疫沈降物を図に示した抗体を用いて免疫ブロット(IB)した。全細胞溶解物を各タンパク質の発現レベルについて、免疫ブロット解析した (第3パネル、第4パネル)。検出は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ共役された二次抗体を用いて行った。COS7細胞をxpress-NEDL1発現プラスミドでトランスフェクトし、同様の実験を行った (図3)。これらの結果から、NEDL1とTRAP δ との結合が外因性TRAP δ について確認された。

【0047】

(実施例 2) NEDL1とSOD1変異体との結合

NEDL1およびFLAGタグSOD1変異体または野生型SOD1を過剰発現するCOS7細胞からの全細胞溶解物を抗FLAG抗体(第1パネル)または抗NEDL1抗体(第2パネル)を用いて、免疫沈降させ、それから抗NEDL1抗体または抗FLAG抗体を用いて、免疫ブロットした。NEDL1またはFLAGタグSOD1変異体の発現を抗NEDL1抗体(第3パネル)または抗FLAG抗体(第4パネル)を用いて、それぞれ解析した(図4)。発症後、急速な臨床経過を辿り、患者が1.5年以内に死亡するSOD1変異体(C6F、A4V)は、NEDL1と強く結合していることが分かる(図4、レーン3、4)。一方、発症後緩徐な臨床経過を示す、SOD1変異体(L126S、H46R、D90A)は、ほとんどNEDL1と結合をしていないことが分かる(図4、レーン11~13)。発症後特異な神経症状を示す変異である、SOD1変異体(G93A)は、NEDL1と中程度の結合をしていることが分かる。また、野生型SOD1とNEDL1は結合しない(共沈しない)ことも分かる(レーン2)。

【0048】

(実施例 3) TRAP δ とSOD1変異体との結合

COS7細胞をFLAGタグTRAP δ およびMycタグSOD1変異体またはMycタグ野生型SOD1をコードする発現プラスミドで一過的に共トランスフェクトした。全細胞溶解物を抗Myc抗体(第1パネル)または抗FLAG抗体(第2パネル)を用いて、免疫沈降させ、それから抗FLAG抗体または抗Myc抗体を用いて、免疫ブロットした(図7)。FLAGタグTRAP δ またはMycタグSOD1変異体の発現を抗FLAG抗体(第3パネル)または抗Myc抗体(第4パネル)を用いて、それぞれ解析した。発症後、急速な臨床経過を辿り、患者が1.5年以内に死亡するSOD1変異体(A4V)は、TRAP δ と強く結合していることが分かる(図7、レーン4)。一方、発症後緩徐な臨床経過を示す、SOD1変異体(H46R)は、ほとんどTRAP δ と結合をしていないことが分かる(レーン6)。また、野生型SOD1とTRAP δ は結合しない(共沈しない)ことも分かる(レーン3)。

【0049】

(実施例 4) NEDL1依存性ユビキチン化

NEDL1は、SOD1変異体をSOD1のタイプに依存する様式でユビキチン化した。COS7細胞を図5に示した発現プラスミドを用いて、一過的に共トランスフェクトした。トランスフェクトしたCOS7細胞からの全細胞溶解物を抗Myc抗体で免疫沈降させて、抗ユビキチン抗体を用いて免疫ブロットした(上部パネル)。ユビキチン化の程度は、ほぼFALSの臨床重症度(A4V>G93A>H46R)に比例した。全細胞溶解物を抗NEDL1抗体で免疫ブロットし、トランスフェクトしたNEDL1の発現を確認した(下部パネル)。図中、矢印は、ユビキチン化されていないSOD1の位置を示し、左側に分子量マーカーの位置を示してある。

【0050】

(実施例 5) NEDL1の存在下、または不在下の野生型SOD1およびSOD1変異体の半減期シクロヘキシジンを添加後(終濃度50 μ g/ml)、図6に示したような異なる時点で回収した、空ベクターまたはNEDL1発現プラスミドでトランスフェクトしたNeuro2a細胞の溶解物を抗FLAG抗体で免疫ブロットして、SOD1蛋白レベルを分析した。SOD1変異体は、野生型SOD1より迅速に分解された。NEDL1は、野生型SOD1の分解に影響を及ぼさなかった。SOD1変異体タンパク質の分解は、促進され、NEDL1の存在下、SOD1変異体タンパク質の半減期は、ほぼFALSの重症度(A4V>G93A>H46R)に比例して減少してゆくことが分かる。

【0051】

(実施例 6) NEDL1とDvl1との結合

COS7細胞中、MycタグDvl1をNEDL1とともに過剰発現させた。全細胞溶解物を抗NEDL1抗体で免疫沈降させ、続いて抗Myc抗体を用いて免疫ブロットした(図8の上部パネル)。MycタグDvl1の発現レベルを抗Myc抗体を用いて、免疫ブロットし解析した(下部パネル)

(実施例 7) Dvl1のNEDL1依存性ユビキチン化

NEDL1は、COS7細胞中Dvl1をユビキチン化した。COS7細胞を図9に示した発現プラスミドを用いて、一過的に共トランスフェクトした。トランスフェクトしたCOS7細胞からの全細胞溶解物を抗Myc抗体で免疫沈降させて、抗ユビキチン抗体を用いて免疫ブロットした(

上部パネル)。全細胞溶解物を抗xpress-NEDL1抗体(中段パネル)または抗Myc抗体(下段パネル)で免疫ブロットし、トランスフェクトしたNEDL1またはMyc-Dvl1の発現を確認した。

【0052】

(実施例8) NEDL1によるDvl1の分解

Neuro2a細胞をFLAGタグDvl1用の発現プラスミドを用いて、NEDL1発現プラスミドの存在下、または不在のもとでトランスフェクトした。トランスフェクト細胞をシクロヘキシジン添加後(終濃度50 μ g/ml)、図10に示したような異なる時点で回収した。Neuro2a細胞溶解物を抗FLAG抗体で免疫ブロットして、Dvl1蛋白レベルを分析した。NEDL1の存在下、FLAG-Dvl1の半減期は、顕著に減少した。

【0053】

(実施例9) Dvl1とSOD1変異体との結合

COS7細胞を図11に示した発現プラスミドで一過的に共トランスフェクトした。全細胞溶解物を抗Myc抗体で、免疫沈降させ、それから抗FLAG抗体または抗Myc抗体を用いて、免疫ブロットした。NEDL1の存在下、Dvl1とSOD1変異体との結合が強まっていることが分かる(図11、レーン4)。結合能は、ほぼFALSの重症度(A4V>G93A>H46R)に比例して減少してゆくことも分かる。

【産業上の利用可能性】

【0054】

以上説明したように、本発明は、NEDL1とSOD1変異体との結合能、或いはNEDL1存在下、または非存在下でのNEDL1関連因子とSOD1変異体との結合能を評価することによって、前記SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度の判定を可能にし、FALSの診断に役に立つ。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】図1は、ヒトNEDL1(hNEDL1)とマウスNEDL1(mNEDL1)との間の保存的アミノ酸配列のアライメントを示す図である。図中、右欄番号は、イニシエーターであるメチオニンからの塩基数を表す。C2ドメイン、WWドメインおよびHECTドメインがそれぞれ示されている。

【図2】NEDL1とTRAP- δ との結合を示す免疫ブロットした電気泳動図(免疫ブロット図)である。

【図3】NEDL1と内因性TRAP- δ との結合を示す免疫ブロットした電気泳動図である。

【図4】NEDL1とSOD1変異体との結合を示す免疫ブロット図である。

【図5】NEDL1の野生型SOD1およびSOD1変異体に対するユビキチン化を示す免疫ブロット図である。

【図6】NEDL1の存在下、SOD1変異体および野生型SOD1の分解の経時変化を示す免疫ブロット図である。

【図7】SOD1変異体と外因性TRAP δ との結合を示す免疫ブロット図である。

【図8】NEDL1とDvl1との結合を示す免疫ブロット図である。

【図9】NEDL1のDvl1に対するユビキチン化を示す免疫ブロット図である。

【図10】NEDL1の存在下、Dvl1の分解の経時変化を示す免疫ブロット図である。

【図11】NEDL1の存在下、SOD1変異体とDvl1との結合を示す免疫ブロット図である。

。

【図12】FALS病理発生におけるSOD1変異体とその関連分子との間の相互作用の模式図を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

<120> Method for determining clinical malignancy of FALS

<130> JP03-1448HM

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223>

<400> 1

Met	Ala	Ser	Pro	Ser	Arg	Asn	Ser	Gln	Ser	Arg	Arg	Arg	Cys	Lys	Glu
1				5				10					15		

Pro	Leu	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Pro	Asp	Gln	Phe	His	Asn	Met	Asp	Leu
			20					25					30		

Arg	Gly	Gly	Pro	His	Asp	Gly	Val	Thr	Ile	Pro	Arg	Ser	Thr	Ser	Asp
		35					40					45			

Thr	Asp	Leu	Val	Thr	Ser	Asp	Ser	Arg	Ser	Thr	Leu	Met	Val	Ser	Ser
	50					55					60				

Ser	Tyr	Tyr	Ser	Ile	Gly	His	Ser	Gln	Asp	Leu	Val	Ile	His	Trp	Asp
65					70					75					80

Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Asp	Ala	Gly	Asp	Trp	Ile	Gly	Met	Tyr	Leu	Ile
				85				90						95	

Asp	Glu	Val	Leu	Ser	Glu	Asn	Phe	Leu	Asp	Tyr	Lys	Asn	Arg	Gly	Val
			100					105					110		

Asn	Gly	Ser	His	Arg	Gly	Gln	Ile	Ile	Trp	Lys	Ile	Asp	Ala	Ser	Ser
			115				120					125			

Tyr Phe Val Glu Pro Glu Thr Lys Ile Cys Phe Lys Tyr Tyr His Gly
 130 135 140
 Val Ser Gly Ala Leu Arg Ala Thr Thr Pro Ser Val Thr Val Lys Asn
 145 150 155 160
 Ser Ala Ala Pro Ile Phe Lys Ser Ile Gly Ala Asp Glu Thr Val Gln
 165 170 175
 Gly Gln Gly Ser Arg Arg Leu Ile Ser Phe Ser Leu Ser Asp Phe Gln
 180 185 190
 Ala Met Gly Leu Lys Lys Gly Met Phe Phe Asn Pro Asp Pro Tyr Leu
 195 200 205
 Lys Ile Ser Ile Gln Pro Gly Lys His Ser Ile Phe Pro Ala Leu Pro
 210 215 220
 His His Gly Gln Glu Arg Arg Ser Lys Ile Ile Gly Asn Thr Val Asn
 225 230 235 240
 Pro Ile Trp Gln Ala Glu Gln Phe Ser Phe Val Ser Leu Pro Thr Asp
 245 250 255
 Val Leu Glu Ile Glu Val Lys Asp Lys Phe Ala Lys Ser Arg Pro Ile
 260 265 270
 Ile Lys Arg Phe Leu Gly Lys Leu Ser Met Pro Val Gln Arg Leu Leu
 275 280 285
 Glu Arg His Ala Ile Gly Asp Arg Val Val Ser Tyr Thr Leu Gly Arg
 290 295 300
 Arg Leu Pro Thr Asp His Val Ser Gly Gln Leu Gln Phe Arg Phe Glu
 305 310 315 320
 Ile Thr Ser Ser Ile His Pro Asp Asp Glu Glu Ile Ser Leu Ser Thr
 325 330 335
 Glu Pro Glu Ser Ala Gln Ile Gln Asp Ser Pro Met Asn Asn Leu Met
 340 345 350
 Glu Ser Gly Ser Gly Glu Pro Arg Ser Glu Ala Pro Glu Ser Ser Glu
 355 360 365
 Ser Trp Lys Pro Glu Gln Leu Gly Glu Gly Ser Val Pro Asp Arg Pro
 370 375 380
 Gly Asn Gln Ser Ile Glu Leu Ser Arg Pro Ala Glu Glu Ala Ala Val
 385 390 395 400

Ile Thr Glu Ala Gly Asp Gln Gly Met Val Ser Val Gly Pro Glu Gly
 405 410 415
 Ala Gly Glu Leu Leu Ala Gln Val Gln Lys Asp Ile Gln Pro Ala Pro
 420 425 430
 Ser Ala Glu Glu Leu Ala Glu Gln Leu Asp Leu Gly Glu Glu Ala Ser
 435 440 445
 Ala Leu Leu Leu Glu Asp Gly Glu Ala Pro Ala Ser Thr Lys Glu Glu
 450 455 460
 Pro Leu Glu Glu Glu Ala Thr Thr Gln Ser Arg Ala Gly Arg Glu Glu
 465 470 475 480
 Glu Glu Lys Glu Gln Glu Glu Gly Asp Val Ser Thr Leu Glu Gln
 485 490 495
 Gly Glu Gly Arg Leu Gln Leu Arg Ala Ser Val Lys Arg Lys Ser Arg
 500 505 510
 Pro Cys Ser Leu Pro Val Ser Glu Leu Glu Thr Val Ile Ala Ser Ala
 515 520 525
 Cys Gly Asp Pro Glu Thr Pro Arg Thr His Tyr Ile Arg Ile His Thr
 530 535 540
 Leu Leu His Ser Met Pro Ser Ala Gln Gly Gly Ser Ala Ala Glu Glu
 545 550 555 560
 Glu Asp Gly Ala Glu Glu Glu Ser Thr Leu Lys Asp Ser Ser Glu Lys
 565 570 575
 Asp Gly Leu Ser Glu Val Asp Thr Val Ala Ala Asp Pro Ser Ala Leu
 580 585 590
 Glu Glu Asp Arg Glu Glu Pro Glu Gly Ala Thr Pro Gly Thr Ala His
 595 600 605
 Pro Gly His Ser Gly Gly His Phe Pro Ser Leu Ala Asn Gly Ala Ala
 610 615 620
 Gln Asp Gly Asp Thr His Pro Ser Thr Gly Ser Glu Ser Asp Ser Ser
 625 630 635 640
 Pro Arg Gln Gly Gly Asp His Ser Cys Glu Gly Cys Asp Ala Ser Cys
 645 650 655
 Cys Ser Pro Ser Cys Tyr Ser Ser Ser Cys Tyr Ser Thr Ser Cys Tyr

660 665 670
 Ser Ser Ser Cys Tyr Ser Ala Ser Cys Tyr Ser Pro Ser Cys Tyr Asn
 675 680 685
 Gly Asn Arg Phe Ala Ser His Thr Arg Phe Ser Ser Val Asp Ser Ala
 690 695 700
 Lys Ile Ser Glu Ser Thr Val Phe Ser Ser Gln Asp Asp Glu Glu Glu
 705 710 715 720
 Glu Asn Ser Ala Phe Glu Ser Val Pro Asp Ser Met Gln Ser Pro Glu
 725 730 735
 Leu Asp Pro Glu Ser Thr Asn Gly Ala Gly Pro Trp Gln Asp Glu Leu
 740 745 750
 Ala Ala Pro Ser Gly His Val Glu Arg Ser Pro Glu Gly Leu Glu Ser
 755 760 765
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Asn Arg Arg Glu Gly Glu Cys Pro Ile Leu
 770 775 780
 His Asn Ser Gln Pro Val Ser Gln Leu Pro Ser Leu Arg Pro Glu His
 785 790 795 800
 His His Tyr Pro Thr Ile Asp Glu Pro Leu Pro Pro Asn Trp Glu Ala
 805 810 815
 Arg Ile Asp Ser His Gly Arg Val Phe Tyr Val Asp His Val Asn Arg
 820 825 830
 Thr Thr Thr Trp Gln Arg Pro Thr Ala Ala Ala Thr Pro Asp Gly Met
 835 840 845
 Arg Arg Ser Gly Ser Ile Gln Gln Met Glu Gln Leu Asn Arg Arg Tyr
 850 855 860
 Gln Asn Ile Gln Arg Thr Ile Ala Thr Glu Arg Ser Glu Glu Asp Ser
 865 870 875 880
 Gly Ser Gln Ser Cys Glu Gln Ala Pro Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 885 890 895
 Gly Ser Asp Ser Glu Ala Glu Ser Ser Gln Ser Ser Leu Asp Leu Arg
 900 905 910
 Arg Glu Gly Ser Leu Ser Pro Val Asn Ser Gln Lys Ile Thr Leu Leu
 915 920 925

Leu Gln Ser Pro Ala Val Lys Phe Ile Thr Asn Pro Glu Phe Phe Thr
 930 935 940
 Val Leu His Ala Asn Tyr Ser Ala Tyr Arg Val Phe Thr Ser Ser Thr
 945 950 955 960
 Cys Leu Lys His Met Ile Leu Lys Val Arg Arg Asp Ala Arg Asn Phe
 965 970 975
 Glu Arg Tyr Gln His Asn Arg Asp Leu Val Asn Phe Ile Asn Met Phe
 980 985 990
 Ala Asp Thr Arg Leu Glu Leu Pro Arg Gly Trp Glu Ile Lys Thr Asp
 995 1000 1005
 Gln Gln Gly Lys Ser Phe Phe Val Asp His Asn Ser Arg Ala Thr Thr
 1010 1015 1020
 Phe Ile Asp Pro Arg Ile Pro Leu Gln Asn Gly Arg Leu Pro Asn His
 1025 1030 1035 1040
 Leu Thr His Arg Gln His Leu Gln Arg Leu Arg Ser Tyr Ser Ala Gly
 1045 1050 1055
 Glu Ala Ser Glu Val Ser Arg Asn Arg Gly Ala Ser Leu Leu Ala Arg
 1060 1065 1070
 Pro Gly His Ser Leu Val Ala Ala Ile Arg Ser Gln His Gln His Glu
 1075 1080 1085
 Ser Leu Pro Leu Ala Tyr Asn Asp Lys Ile Val Ala Phe Leu Arg Gln
 1090 1095 1100
 Pro Asn Ile Phe Glu Met Leu Gln Glu Arg Gln Pro Ser Leu Ala Arg
 1105 1110 1115 1120
 Asn His Thr Leu Arg Glu Lys Ile His Tyr Ile Arg Thr Glu Gly Asn
 1125 1130 1135
 His Gly Leu Glu Lys Leu Ser Cys Asp Ala Asp Leu Val Ile Leu Leu
 1140 1145 1150
 Ser Leu Phe Glu Glu Glu Ile Met Ser Tyr Val Pro Leu Gln Ala Ala
 1155 1160 1165
 Phe His Pro Gly Tyr Ser Phe Ser Pro Arg Cys Ser Pro Cys Ser Ser
 1170 1175 1180
 Pro Gln Asn Ser Pro Gly Leu Gln Arg Ala Ser Ala Arg Ala Pro Ser
 1185 1190 1195 1200

Pro Tyr Arg Arg Asp Phe Glu Ala Lys Leu Arg Asn Phe Tyr Arg Lys
 1205 1210 1215

Leu Glu Ala Lys Gly Phe Gly Gln Gly Pro Gly Lys Ile Lys Leu Ile
 1220 1225 1230

Ile Arg Arg Asp His Leu Leu Glu Gly Thr Phe Asn Gln Val Met Ala
 1235 1240 1245

Tyr Ser Arg Lys Glu Leu Gln Arg Asn Lys Leu Tyr Val Thr Phe Val
 1250 1255 1260

Gly Glu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Gly Pro Ser Arg Glu Phe Phe Phe
 1265 1270 1275 1280

Leu Leu Ser Gln Glu Leu Phe Asn Pro Tyr Tyr Gly Leu Phe Glu Tyr
 1285 1290 1295

Ser Ala Asn Asp Thr Tyr Thr Val Gln Ile Ser Pro Met Ser Ala Phe
 1300 1305 1310

Val Glu Asn His Leu Glu Trp Phe Arg Phe Ser Gly Arg Ile Leu Gly
 1315 1320 1325

Leu Ala Leu Ile His Gln Tyr Leu Leu Asp Ala Phe Phe Thr Arg Pro
 1330 1335 1340

Phe Tyr Lys Ala Leu Leu Arg Leu Pro Cys Asp Leu Ser Asp Leu Glu
 1345 1350 1355 1360

Tyr Leu Asp Glu Glu Phe His Gln Ser Leu Gln Trp Met Lys Asp Asn
 1365 1370 1375

Asn Ile Thr Asp Ile Leu Asp Leu Thr Phe Thr Val Asn Glu Glu Val
 1380 1385 1390

Phe Gly Gln Val Thr Glu Arg Glu Leu Lys Ser Gly Gly Ala Asn Thr
 1395 1400 1405

Gln Val Thr Glu Lys Asn Lys Lys Glu Tyr Ile Glu Arg Met Val Lys
 1410 1415 1420

Trp Arg Val Glu Arg Gly Val Val Gln Gln Thr Glu Ala Leu Val Arg
 1425 1430 1435 1440

Gly Phe Tyr Glu Val Val Asp Ser Arg Leu Val Ser Val Phe Asp Ala
 1445 1450 1455

Arg Glu Leu Glu Leu Val Ile Ala Gly Thr Ala Glu Ile Asp Leu Asn

1460	1465	1470
Asp Trp Arg Asn Asn Thr Glu Tyr Arg Gly Gly Tyr His Asp Gly His		
1475	1480	1485
Leu Val Ile Arg Trp Phe Trp Ala Ala Val Glu Arg Phe Asn Asn Glu		
1490	1495	1500
Gln Arg Leu Arg Leu Leu Gln Phe Val Thr Gly Thr Ser Ser Val Pro		
1505	1510	1515 1520
Tyr Glu Gly Phe Ala Ala Leu Arg Gly Ser Asn Gly Leu Arg Arg Phe		
1525	1530	1535
Cys Ile Glu Lys Trp Gly Lys Ile Thr Ser Leu Pro Arg Ala His Thr		
1540	1545	1550
Cys Phe Asn Arg Leu Asp Leu Pro Pro Tyr Pro Ser Tyr Ser Met Leu		
1555	1560	1565
Tyr Glu Lys Leu Leu Thr Ala Val Glu Glu Thr Ser Thr Phe Gly Leu		
1570	1575	1580

Glu
1585

<210> 2
<211> 6200
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223>

<400> 2

```

ggttttttagg cctggccgcc atggcgtctc cttctagaaa ctcccagagc cgacgccggt 60
gcaaggagcc gctccgatac agctacaacc ccgaccagtt ccacaacatg gacctcaggg 120
gcggcccccga cgatggcgctc accattcccc gctccaccag cgacactgac ctggtcacct 180
cggacagccg ctccacgctc atggtcagca gctcctacta ttccatcggg cactctcagg 240
acctggtcat ccaactgggac ataaaggagg aagtggacgc tggggactgg attggcatgt 300
acctcattga tgaggtcttg tccgaaaact ttctggacta taaaaaccgt ggagtcaatg 360
gttctcatcg gggccagatc atctggaaga tcgatgccag ctctgtacttt gtggaacctg 420
aaactaagat ctgcttcaaa tactaccatg gagtgagtgg ggccctgcga gcaaccaccc 480
ccagtgtcac ggtcaaaaac tcggcagctc ctatttttaa aagcattggt gctgatgaga 540
ccgtccaagg acaaggaagt cggaggctga tcagcttctc tctctcagat ttccaagcca 600
tggtgttgaa gaaagggatg tttttcaacc cagaccctta tctgaagatt tccattcagc 660
ctgggaaaca cagcatcttc cccgccctcc ctcaccatgg acaggagagg agatccaaga 720
tcataggcaa caccgtgaac cccatctggc aggccgagca attcagtttt gtgtccttgc 780
ccactgacgt gctggaaatt gaggtgaagg acaagtttgc caagagccgc cccatcatca 840

```

agcgcttctt gggaaagctg tcgatgcccg ttcaaagact cctggagaga cacgccatag 900
 gggataggggt ggtcagctac acacttggcc gcaggcttcc aacagatcat gtgagtggac 960
 agctgcaatt ccgatttgag atcacttcct ccatccaccc agatgatgag gagatttccc 1020
 tgagtaccga gcctgagtc gccc aaattc aggacagccc catgaacaac ctgatggaaa 1080
 gcggcagtg ggaacctcg tctgaggcac cagagtcctc tgagagctgg aagccagagc 1140
 agctgggtga gggcagtgtc cccgatcgtc cagggaacca aagcatagag ctttccagac 1200
 cagctgagga agcagcagtc atcacggagg caggagacca gggcatggtc tctgtgggac 1260
 ctgaaggggc tggggagctc ctggcccagg tgcaaaagga catccagcct gccccagtg 1320
 cagaagagct ggccgagcag ctggacctgg gtgaggaggc atcagcactg ctgctggaag 1380
 acggtgaagc cccagccagc accaaggagg agcccttggg ggaggaagca acgaccaga 1440
 gccgggctgg aagggaagaa gaggagaagg agcaggagga ggaggagat gtgtccacc 1500
 tggagcaggg agagggcagg ctgcagctgc gggcctcggg gaagagaaaa agcaggccct 1560
 gctccttgcc tgtgtccgag ctggagacgg tgatcgctc agcctgcggg gaccccaga 1620
 cccgcggac aactacatc cgcattcaca ccctgctgca cagcatgcc tccgccagg 1680
 gcggcagcgc ggcagaggag gaggacggcg cggaggagga gtccaccctc aaggactcct 1740
 cggagaagga tgggctcagc gaggtggaca cgggtggccg tgaccctgtt gccctggaag 1800
 aggacagaga agagcccag ggggctactc caggcacggc gcaccctggc cactccgggg 1860
 gccacttccc cagcctggcc aatggcgcg gcccaggatg cgacacgcac cccagcaccg 1920
 ggagcgagag cgactccagc cccaggcaag gcggggacca cagtgcgag ggctgtgacg 1980
 cgtcctgctg cagcccctcg tgctacagct cctcgtgcta cagcacgtcc tgctacagca 2040
 gctcgtgcta cagcgctcg tgctacagcc cctcctgcta caacggcaac aggttcgcca 2100
 gccacacgcg cttctcctcc gtggacagcg ccaagatctc cgagagcacg gtcttctcct 2160
 cgcaagacga cgaggaggag gagaacagcg cgttcgagtc ggtaccgcac tccatgcaga 2220
 gccctgagct ggacccggag tccacgaacg gcgctgggccc gtggcaagac gagctggccc 2280
 cccctagcgg gcacgtggaa agaagcccgg aaggtctgga atccccctg gcaggccaa 2340
 gcaatcggag agaaggtgaa tgtcctatac tccataattc ccagccagta agccagcttc 2400
 cttccctgag gcctgaacat catcactacc caacaatcga tgagcctctt ccaccaaact 2460
 gggaagctcg aattgacagc cacgggcggg tcttttatgt ggaccacgtg aaccgcacaa 2520
 ccacctggca gcgtccgacg gcagcagcca ccccgatgg catgcggaga tcggggcca 2580
 tccagcagat ggagcaactc aacaggcggg atcaaaacat tcagcgaacc attgcaacag 2640
 agaggtccga agaagattct ggcagccaaa gctgcgagca agccccagca ggaggaggcg 2700
 gaggtggagg gagtgactca gaagccgaat cttcccagtc cagcttagat ctaaggagag 2760
 aggggtcact ttctccagtg aactcacaaa aaatcacctt gctgctgcag tccccagcgg 2820
 tcaagttcat caccaacccc gagttcttca ctgtgtaca tgccaattat agtgctacc 2880
 gagtcttcac cagtagcacc tgcttaaagc acatgattct gaaagtccga cgggatgctc 2940
 gcaattttga acgctaccag cacaaccggg acttggtgaa ttcatcaac atgttcgcag 3000
 aactcggct ggaactgccc cggggctggg agatcaaaac ggaccagcag ggaaagtctt 3060
 tttcgtgga ccacaacagt cgagctacca ctttcattga cccccgaatc cctcttcaga 3120
 acggtcgtct tccaatcat ctaactcacc gacagcacct ccagaggctc cgaagttaca 3180
 gcgctggaga ggcctcagaa gtttctagaa acagaggagc ctctttactg gccaggccag 3240
 gacacagctt agtagctgct attcgaagcc aacatcaaca tgagtcattg ccactggcat 3300
 ataatgacaa gattgtggca tttcttcgcc agccaaacat ttttgaaatg ctgcaagagc 3360
 gtcagccaag cttagcaaga aaccacacac tcaggagagaa aatccattac attcgactg 3420
 agggtaatca cgggcttgag aagttgtcct gtgatgcgga tctggtcatt ttgctgagtc 3480
 tctttgaaga agagattatg tcctacgtcc ccctgcaggc tgccctccac cctgggtata 3540
 gcttctctcc ccgctgttca ccctgttctt cacctcagaa ctcccaggt ttacagagag 3600
 ccagtgaag agccccctcc ccctaccgaa gagactttga ggccaagctc cgcaatttct 3660
 acagaaaact ggaagccaaa ggatttggtc aggggtccggg gaaaattaag ctattattc 3720
 gccgggatca tttgttgag ggaaccttca atcaggatg ggcctattcg cggaagagc 3780
 tccagcgaac caagctctac gtcacctttg ttggagagga gggcctggac tacagtggcc 3840

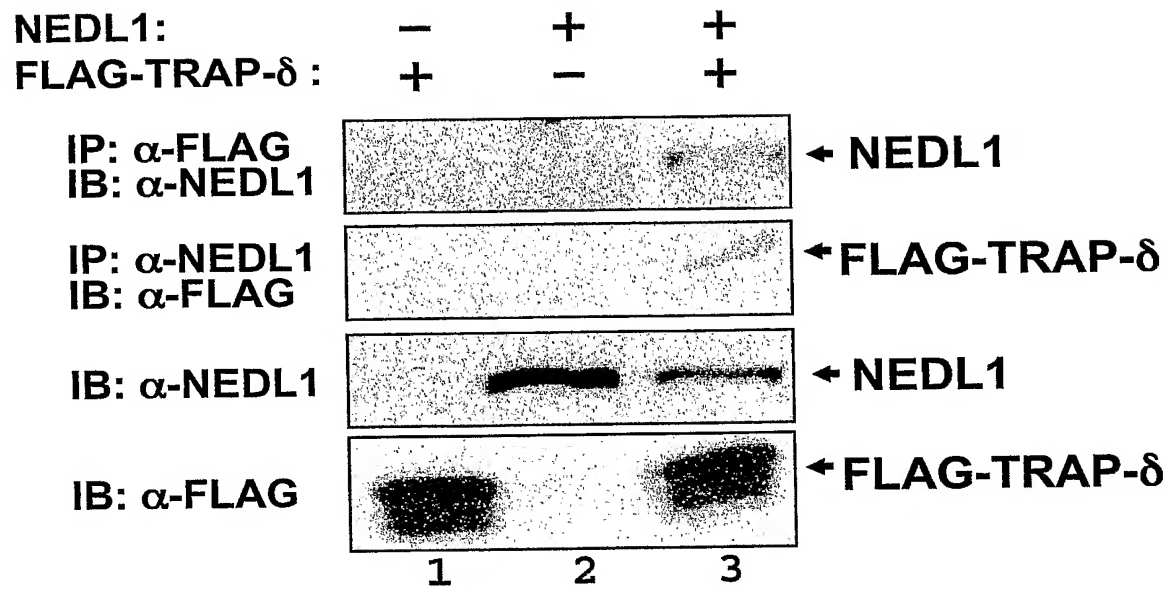
cctcgcggga gttcttcttc cttctgtctc aggagctctt caacccttac tatggactct 3900
 ttgagtactc ggcaaatgat acttacacgg tgcagatcag ccccatgtcc gcattttag 3960
 aaaaccatct tgagtggttc aggttttagcg gtcgcatcct ggggtctggct ctgatccatc 4020
 agtaccttct tgacgctttc ttcacgaggc ctttctacaa ggcactcctg agactgccct 4080
 gtgatttgag tgacctggaa tatttgatg aggaattcca ccagagtttg cagtggatga 4140
 aggacaacaa catcacagac atcttagacc tcactttcac tgtaaatgaa gaggtttttg 4200
 gacaggtcac ggaaagggag ttgaagtctg gaggagccaa cacacaggtg acggagaaaa 4260
 acaagaagga gtacatcgag cgcattggtga agtggcgggt ggagcgcggc gtggtacagc 4320
 agaccgaggc gctggtgcgc ggcttctacg aggtttaga ctcgaggctg gtgtccgtgt 4380
 ttgatgccag ggagctggag ctggtgatag ctggcaccgc ggaaatcgac ctaaactgact 4440
 ggcggaataa cactgagtac cggggagggt accacgatgg gcattttag atccgctggt 4500
 tctgggctgc ggtggagcgc ttcaataatg agcagaggct gagattactg cagtttgtca 4560
 cgggaacatc cagcgtgccc tacgaaggct tcgcagccct ccgtgggagc aatgggcttc 4620
 ggcgcttctg catagagaaa tgggggaaaa ttacttctct cccagggca cacacatgct 4680
 tcaaccgact ggatcttcca ccgtatccct cgtactccat gttgtatgaa aagctgttaa 4740
 cagcagtaga ggaaaccagc accttggac ttgagtgagg acatggaacc tcgcctgaca 4800
 ttttctggc cagtgcacatc acccttctg ggatgatccc cttttccctt tcccttaatc 4860
 aactctcctt tgattttggt attccatgat ttttattttc aaaccaaatc aggatgaca 4920
 aaagctgtgc atgaagaact gccttcttct aagatctaac cttcaggctt ctctcctctg 4980
 ttttcaatga actgctagcc tgtatgcaat attaaaaaac agctgtctca aggtctgtgt 5040
 atatctccac atacctccat tactaacaat gaaatatgaa tgcaagttaa gctacacttg 5100
 accaaatggt aataaatgtt tacttccatt tctatcattg aagggaatat gtgagcatta 5160
 agcactccag gctttcatat gccatgtct tctgagcaga gccaccattt tttataattt 5220
 ctaataacca actccagaac taggagctga tcaactctt gtttctctt ccactactt 5280
 ttccctgtgc ataatatcca tcaaaggac aacagtggca aagctgaaat ttttatacat 5340
 tcaactcatg attcacatgt ggcatcagtc ccatcagccg gaactagcct agacatacgg 5400
 tgcaaatatg acacttctaa cgattaacaa cagcaagaaa acacctgctg ctgatgcaat 5460
 gcaatgcac ccaatggttg tggggattgt gggctcaact caagagaagt ttaggagggg 5520
 gagcatccct agtgaatact cacaccacaa gaaggacaaa cttgtgcaca tgtccaagaa 5580
 agaaagcttc ttgattgagg tagcatgaag gatgaggctt cagccccat tgtcttatgt 5640
 agaatgtggc aatgccaaact ggagaaaggg aagaaggaca tattacctg gtttgaatcc 5700
 ctgagttctg tactgttctg ttttgtttag tctagccaca gttcttcaca aaggaaaaaa 5760
 aaatgtgtag atgataccat gacttttgtt aaagccatga cttttgtttg cttggcagac 5820
 aaaccctttt tttaaaactt tgatatTTTT tttcacatt tttttctt ttccttctt 5880
 aatcatggag ttcaagttcc tttgcattcg attgtccatc gggaccacac taggaagctg 5940
 cagagagtga tgggtgcttg tagggatcaa gggcaacata gtacttctcc ttcaccata 6000
 gtaatcctcc tggggcagaa acataacacc ccaaaggcac gttgatttgt atcaaaataa 6060
 atatccagtt tcttttagca ttcagtgaac acatatctca gaaaacttca tgtgtcaga 6120
 aaaacagctg caggctccaa agacagccta acctctcaac tacatttgaa ataaaccaa 6180
 ccataatggt aaaaaaaaaa 6200

【書類名】 図面
【図 1】

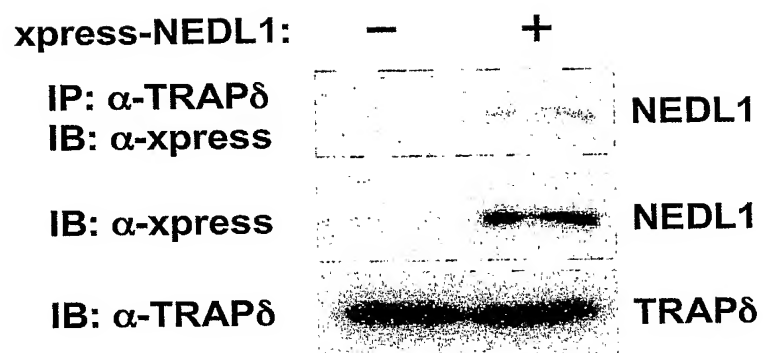
hNEDL1	MASPSRNSQSRRCRCEPLRYSYNPDQFHNMDLRGGPHDGVITPRSTDLDVTSDSRSTLMVSSSYYSIGHSQDLVIHWDIKEEVDAGDWIGMYLIDEVL	100
mNEDL1	MASPSRNSQSRRCRCEPLRYSYNPDQFHNIDIRNGAHDAITPRSTDLDVTSDSRSTLMVSSSYYSIGHSQDLVIHWDIKEEVDAGDWIGMYLIGEV	100
hNEDL1	SENFLDYKNRGVNGSHRGQIWKIDASSYFVEPETKICFKYVHGVSALRATTPSVTVKNSAAPFKSIGAETVQGGQSRRLISFSLSDQFAMGLKKG	200
mNEDL1	SENFLDYKNRGVNGSHRGQIWKIDASSYFVESETKICFKYVHGVRGALRATTPSVTVKNSAAPFKSIGAETVQGGQSRRLISFSLSDQFAMGLKKG	200
hNEDL1	FFNPDPYLYKISIQPKHSIFPALPHHGQERRSKIIGNTVNPVWQAEQFSFVSLPTDYLEIEVKDKFAKSRPIIKRFLGKLSMPVQRLERHAIGDRVVS	300
mNEDL1	FFNPDPYLYKISIQPKHSIFPALPHHGQERRSKIIGNTVNPVWQAEHFSFVSLPTDYLEIEVKDKFAKSRPIIKRFLGKLSMPVQRLERHAIGDRVVS	300
C2 Domain		
hNEDL1	TLGRRLLPTDHSVGLQFRFEITSSIHDPDEEISLSTEPES-AQIQDSPMNNMESGSGEPRSEAPESSESWKPEQLGEGSVDPDRGNQSIELSRPAEEAA	399
mNEDL1	TLGRRLLPTDHSVGLQFRFEITSSIHADDEEISLAEPESSAETQDSIMNSVMGNSNGEPPSGDATEFCDAKPESPSSEGNVNSSENQNHAGPVEEAA	400
hNEDL1	VITEAGDQGMVSVGPEGAGELLAQVOKIQPAPSAEELAEQLDGEASALLLEDGEAPASTKEELEEATTSRAGREEEKEEKEEGDVSTLEQEGE	499
mNEDL1	GAMEARDGSSNVSEAPEEPGELQDPHQDTQPTLSAEVAEGLPLEDSSPSSLPEENTALGSKVEEETVPENGAREEEMQKGDDEEEEDVSTLEQGE-	499
hNEDL1	RLQLRASVKRKRSPCLPVSELETVIASACGDPETPRTHYIRIHTLLHSMPSAQGGSAEEEDGAEESTLKDSSEKGLSEVDTVAADPSALEEDREEP	599
mNEDL1	-----PELETVIASACGDAETPRTHYIRIHTLLHSMPSAQGGSTTEEDGLEESTLKESSEKGLSEVDTVAADPSQMEDGESOG	580
hNEDL1	EGATPGTAHPGHSGGHFSLANGAAGDQDTHPSTGSESDSSPRQGGHSCGCDASCCSPSCYSSSCYSTSCYSSSCYASCSYSPSCYNGNRFASHTRF	699
mNEDL1	ATLCMAPSDCSGGHFSLSKGIAGQDGEAHPSTGSESDSSPQGGHSCGCDASCCSPSCYSTSCYSSSCYSSSCYSSCYN---GNNRFASHTRF	676
hNEDL1	SVDSAKISESTVFSSQDEEEENSFAFESVPDSMQSPQLDPESTNGAGPWQDELAAPSGHVERSPGLESPVAGPSNRREGCEPIHNSQPVSQLPSLRPE	799
mNEDL1	SVDSAKISESTVFSSQDEEEENSFAFESVPDSVQSPQLDPESTNGAGPWQDELAAPGGNAARSTEGLESPMAGPSNRREGCEPIHNSQPVSQLPSLRPE	776
hNEDL1	HHHYPTIDPLPPNWEARIDSHGRVYVDHNRITTTWQRPATPDGMIRSGSVHQMELNRRYQNIQRTIATERSEEDSGSQSCEQAP-AGGGGGGG	898
mNEDL1	HHHYPAIDPLPPNWEARIDSHGRVYVDHNRITTTWQRPSPAPTPDGMIRSGSVHQMELNRRYQNIQRTMATERAEEEDSGNQNSEQIPDGGGGGGGG	876
WW Domain 1		
hNEDL1	DSEAESSQSSDLRREGSLSPVNSQKITLLQSPAVKFINTEFFTVLHANSAYRVFTSSTCLKHMIKVRDRARNFERYQHNRDLVNFIMNFADTRLE	998
mNEDL1	DSEAESSQSSDLRREGSLSPVNSQKVITLLQSPAVKFINTEFFTVLHANSAYRVFTSSTCLKHMIKVRDRARNFERYQHNRDLVNFIMNFADTRLE	976
hNEDL1	LPRGWEIKTDQGGKSFVDHNSRATTFIDPRIPLQNGRLPNHLTHRQHLQRLRSYSAGEASEVSRNRGASLLARPGHSLVAAIRSQHQHESLPLAYNDKI	1098
mNEDL1	LPRGWEIKTDHGGKSFVGHNSRATTFIDPRIPLQNGRLPNHLTHRQHLQRLRSYSAGEASEVSRNRGASLLARPGHSLVAAIRSQHQHESLPLAYNDKI	1076
WW Domain 2		
hNEDL1	VAFLRQPNIFEMLQERQPSLARNHTLREKIHVIRTEGNHGLEKLSCDADLVILLSLFEEIMSYVPLQAAHPGYFSFSPRCSPPCSPQNSPGLQASARA	1198
mNEDL1	VAFLRQPNIFEMLQERQPSLARNHTLREKIHVIRTEGNHGLDKLSCDADLVILLSLFEEIMSYVPLQSAFHPGYFSFSPRCSPPCSPQNSPGLQASARA	1176
hNEDL1	PSPYRRDFAELRNFRYKLEAKGFGQGPVKIKLIRRDHLLGTFNQVMAYSRKELQRNKLIVTFVGEGLDYSGPSREFFLLSQELFNPPYGLFEYSA	1298
mNEDL1	PSPYRRDFAELRNFRYKLEAKGFGQGPVKIKLIRRDHLLGTFNQVMAYSRKELQRNKLIVTFVGEGLDYSGPSREFFLLSQELFNPPYGLFEYSA	1276
hNEDL1	NDITYTVQISPMFAFVENHLEWFRFSGRILGLALIHQYLLDAFFTRPFYKALLRLPCDLSOLEYDEEFHQSLQWMDNNITDILDLTFTVNEEVFGQVTE	1398
mNEDL1	NDITYTVQISPMFAFVENHLEWFRFSGRILGLALIHQYLLDAFFTRPFYKALLRLPCDLSOLEYDEEFHQSLQWMDNNITDILDLTFTVNEEVFGQVTE	1376
hNEDL1	RELKSGGANTQVTEKNKEYIERMVKWRVERGVVQTEALRGFVEVDLSRLVSVDARELELVIAGTAEIDLNDWRNNTYRGGYHGHVLIRWFWA	1498
mNEDL1	RELKSGGANTQVTEKNKEYIERMVKWRVERGVVQTEALLRGFVEVDLSRLVSVDARELELVIAGTAEIDLNDWRNNTYRGGYHGHVLIRWFWA	1476
hNEDL1	ERFNNEQRLRLQFVTGTSSVPYEGFAALRGSNGLRRFCIEKWKITSLPRAHTCFNRDLPPYPSYMLYEKLLTAVEETSTFGLE	1585
mNEDL1	ERFNNEQRLRLQFVTGTSSMPYEGFAALRGSNGLRRFCIEKWKITSLPRAHTCFNRDLPPYPSYMLYEKLLTAVEETSTFGLE	1563

HECT Domain

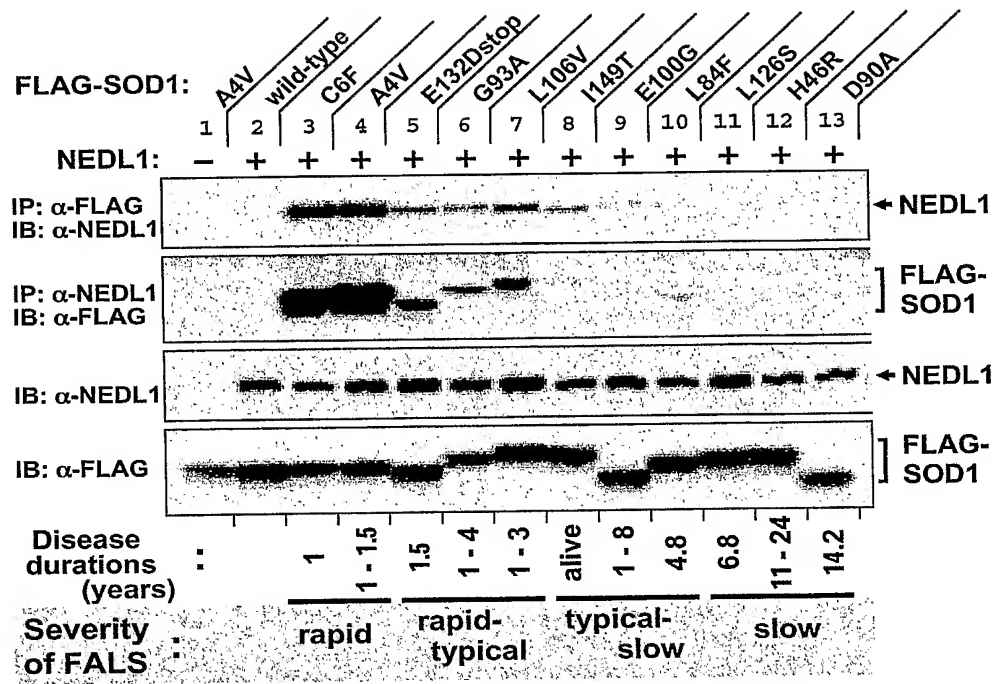
【図 2】



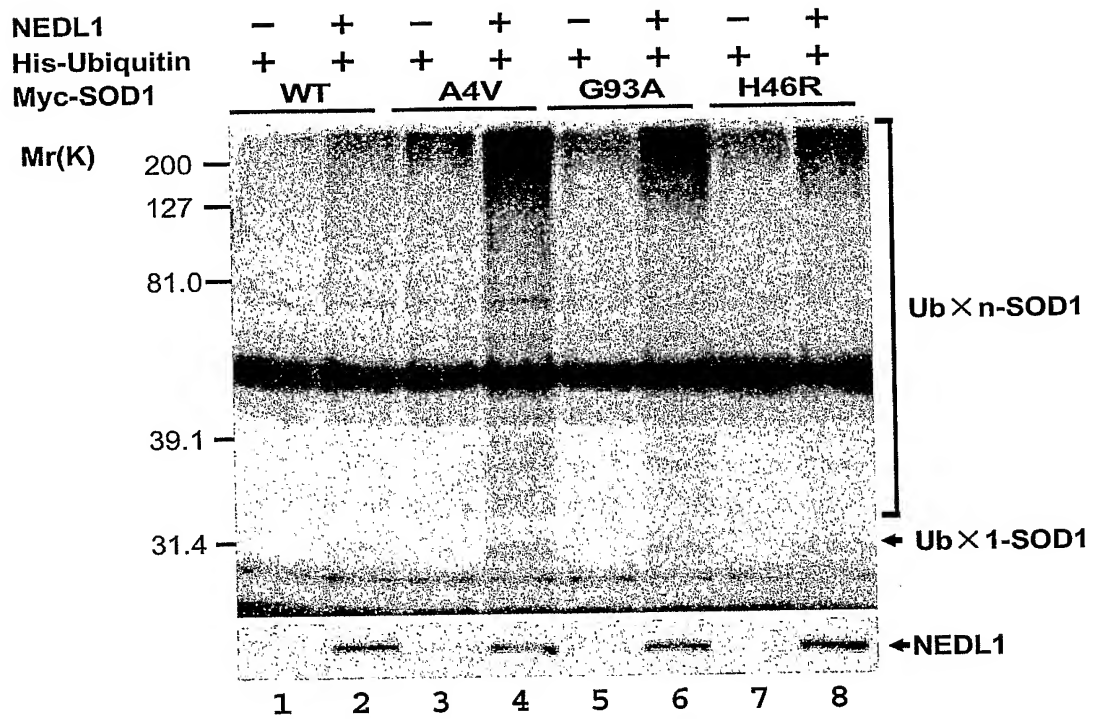
【図 3】



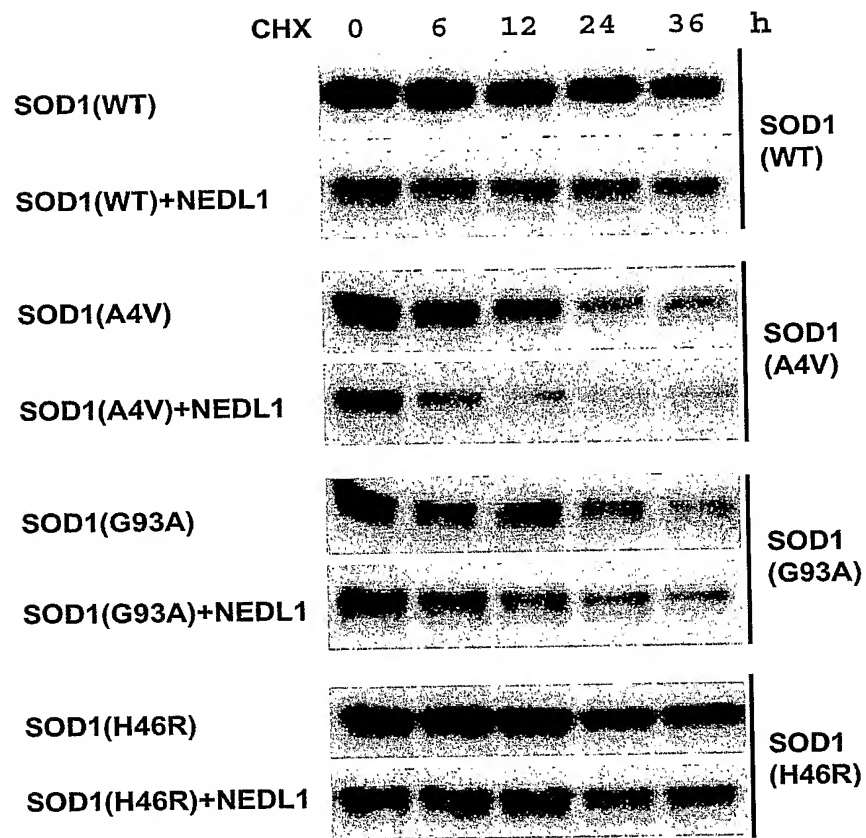
【図 4】



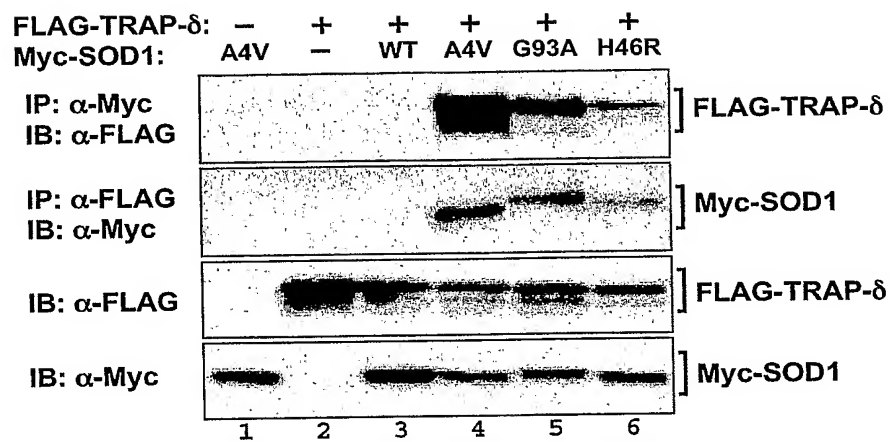
【図 5】



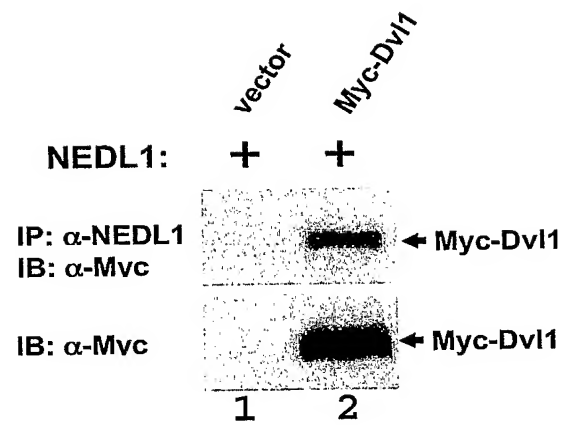
【図 6】



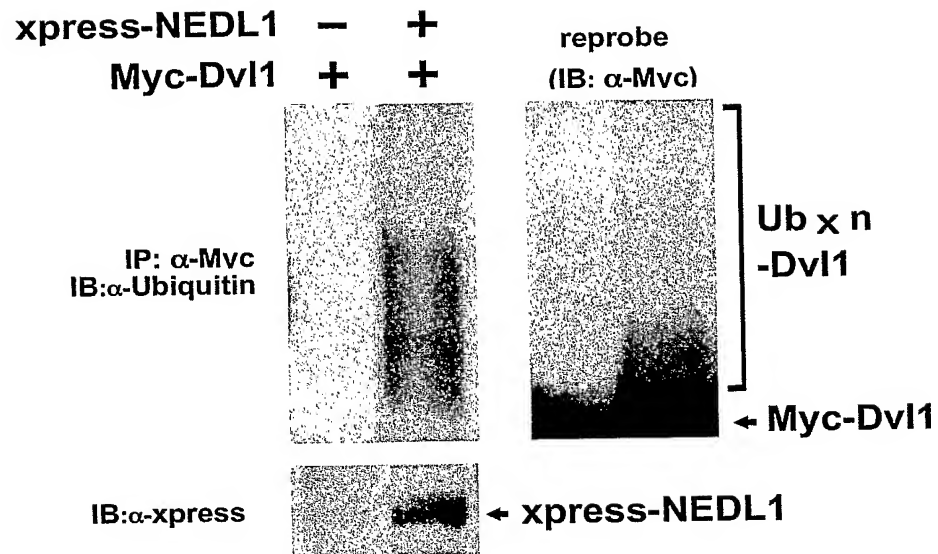
【図 7】



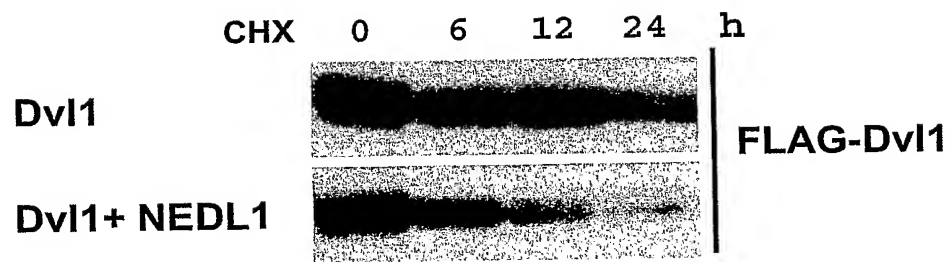
【図 8】



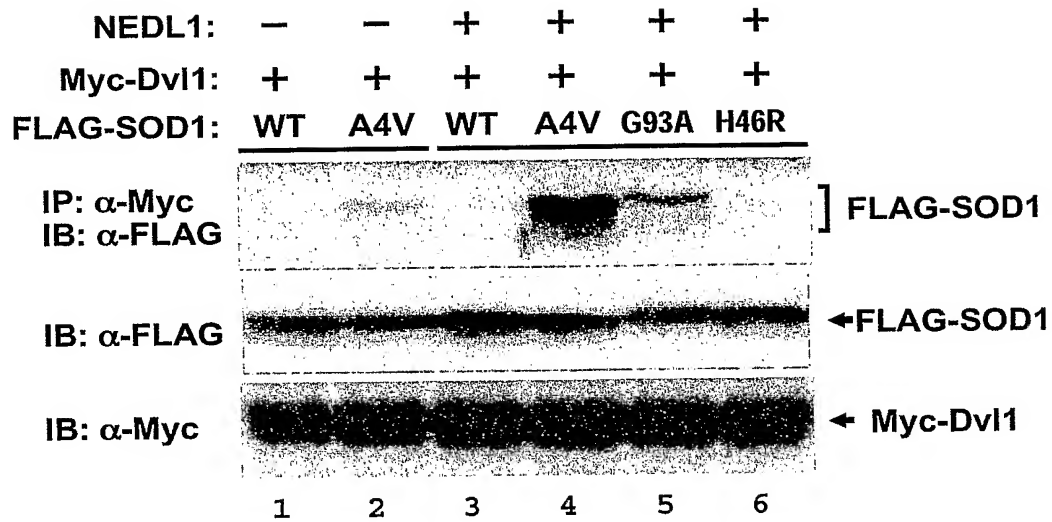
【図 9】



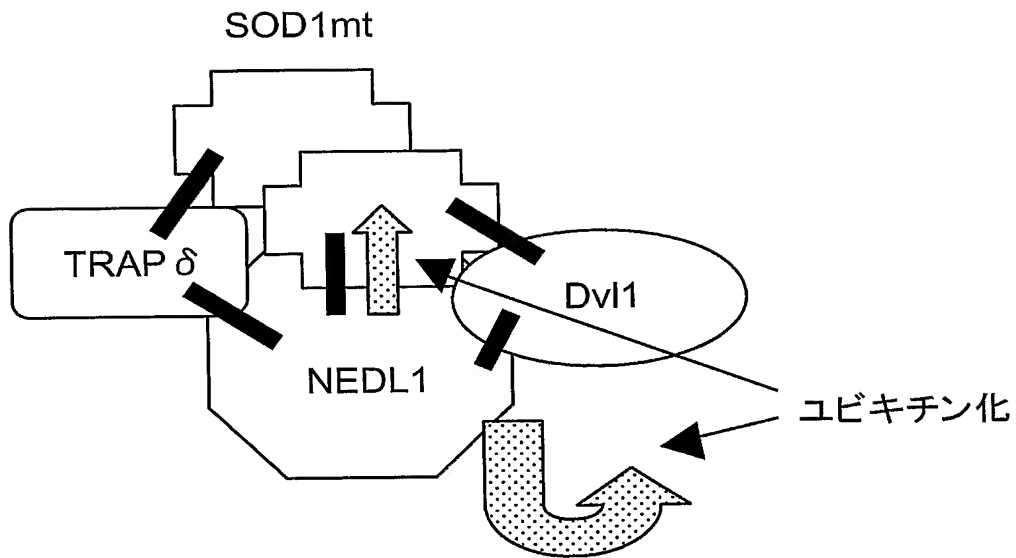
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 FALSの発症メカニズムとしての凝集体仮説を検証し、FALSの診断方法および診断薬を提供する。

【解決手段】 FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1および／またはその関連分子であるTRAP δ またはDv11との結合能を評価して、FALSの臨床悪性度を判定する。

【選択図】 図 1 2

【書類名】 出願人名義変更届
【提出日】 平成16年 7月14日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003-413629
【承継人】
 【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区市場町 1 番 1 号
 【氏名又は名称】 千葉県
【承継人代理人】
 【識別番号】 100088155
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 長谷川 芳樹
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 014708
 【納付金額】 4,200円
【提出物件の目録】
 【物件名】 承継人であることを証明する書面 1
 【援用の表示】 平成 1 6 年 7 月 1 4 日付提出の特願 2 0 0 3 - 3 1 4 3 4 5 の出
 願人名義変更届に添付の譲渡証書
 【物件名】 委任状 1
 【援用の表示】 平成 1 6 年 7 月 1 4 日付提出の特願 2 0 0 3 - 3 1 4 3 4 5 の出
 願人名義変更届に添付の委任状



認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-413629
受付番号	50401193238
書類名	出願人名義変更届
担当官	塩原 啓三 2404
作成日	平成16年10月18日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	591014710
【住所又は居所】	千葉県千葉市中央区市場町1番1号
【氏名又は名称】	千葉県

【承継人代理人】

申請人	
【識別番号】	100088155
【住所又は居所】	東京都中央区銀座一丁目10番6号 銀座ファーストビル 創英国際特許法律事務所
【氏名又は名称】	長谷川 芳樹



特願 2 0 0 3 - 4 1 3 6 2 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 6 0 5 2 2]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 9 月 1 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

佐賀県鳥栖市田代大官町 4 0 8 番地

氏 名

久光製薬株式会社

特願 2 0 0 3 - 4 1 3 6 2 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 1 0 1 4 7 1 0]

1. 変更年月日

1 9 9 2 年 9 月 4 日

[変更理由]

住所変更

住 所

千葉県千葉市中央区市場町 1 番 1 号

氏 名

千葉県